

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-291300

⑪ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)12月3日

C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53
33/58
33/60

A 6807-4B
M 7906-2G
A 7055-2G
Z 7055-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全10頁)

⑭ 発明の名称 高感度特異的核酸の測定法

⑮ 特 願 平1-114853

⑯ 出 願 平1(1989)5月8日

優先権主張 ⑰ 平1(1989)2月28日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 平1-49575

⑳ 発 明 者 石 川 栄 治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

㉑ 発 明 者 田 中 聡 大阪府茨木市大池2丁目29-7

㉒ 出 願 人 石 川 栄 治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

㉓ 出 願 人 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

㉔ 代 理 人 弁理士 細田 芳徳

明 細 書

1. 発明の名称

高感度特異的核酸の測定法

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の(A)、(B)および(C)工程を包含することを特徴とする特異的核酸の測定法。

工程(A): 被検液中の測定すべき特異的核酸と2種以上のプローブを反応せしめ担体上にプローブと測定すべき核酸からなる複合体を結合せしめる工程。

工程(B): 担体から前記複合体を含む成分を解離させる工程。

工程(C): 該成分を測定する工程。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は特異的核酸の高感度測定法に関する。

(従来の技術)

感染症、癌および遺伝子病の臨床検査の

分野において、核酸レベルの異常は蛋白質レベルの異常に先行するため、核酸の測定は病態の把握に、病因の解析に重要な意義を持っている。

従前、前述のごとき核酸の測定はDNA(RNA)プローブを用いたハイブリダイゼーション法によって行われている。

まず、フィルター上に検体から抽出した核酸を固定し、標識プローブをハイブリダイズさせる方法(サザンブロット法、ドット法)がある(第一の技術)。この例としては、リンパ芽球細胞中のEBウイルス(Epstein-Barr Virus)の測定におけるブランドスマ(J. Brandsma)らの報告(プロシードィングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第77巻、第6851頁(1980))がある。細胞をニトロセルローズ膜に固定して、DNAを変性させた後、放射性同位元素で標識したEBウイルスのDNAプロ

ープをハイブリダイズさせて定量したものである。

また、第一のプローブを固定したフィルターに被検液中の測定すべき特異的核酸をトラップし、これに標識した第二のプローブをハイブリダイズさせる方法（サンドイッチ法）がある（第二の技術）。この例としては、鼻咽分泌物中のアデノウィルスの測定におけるバルバ（A. Palva）らの報告（フェムス マイクロバイオリジカル レター（FEMS Microbiol. Lett.）第23巻、第83頁（1984））がある。メンブレンフィルター上に固定したアデノウィルス2型のDNAプローブと放射性同位元素で標識したDNAプローブを用いて、アデノウィルスDNAを定量したものである。

第一の技術では標識DNAプローブが被検体中に多量に存在するゲノムDNAと非特異的にハイブリダイズすることにより、フィルターに吸着するため、測定の特異性

が低くなるとともに、バックグラウンドが高くなり、感度が悪くなるという欠点がある。

第二の技術では、2種のプローブを用いるため、DNAを認識する特異性は高くなるが、フィルター上のDNAプローブの検体DNAトラップ能力に限界がある。もし担体の能力を大きくすれば、その結果、標識プローブのフィルターへの非特異的吸着によるバックグラウンドが大きくなり、いずれにしても高感度化は困難であった。

（発明の解決しようとする課題）

本発明の目的は、このような状況下、標識プローブの非特異的吸着による測定値のバックグラウンドを減少させて高感度のサンドイッチ法による核酸の測定法を提供することにある。

（課題を解決するための手段）

本発明は以下の（A）、（B）および（C）工程を包含することを特徴とする高

感度特異的核酸の測定法である。

工程（A）： 被検液中の測定すべき特異的核酸と2種以上のプローブを反応せしめ担体上にプローブと測定すべき核酸からなる複合体を結合せしめる工程。

工程（B）： 担体から前記複合体を含む成分を解離させる工程。

工程（C）： 該成分量を測定する工程。

以下、本発明について工程順に従い、説明する。

工程（A）について

本工程は被検液中の測定すべき特異的核酸とプローブとを反応せしめ、担体上に核酸—プローブ複合体を結合せしめる工程である。

被検液としては、たとえば、血清、血漿、髄液、尿等の体液、測定すべき核酸を含む緩衝液が挙げられる。測定すべき特異的核酸としては、実質上、従来の核酸プローブ法で測定し得たすべての特異的DNA（RNA）が挙げられる。

例を挙げれば、①血友病A型、血友病B型、

フェニルケトン尿症、 α_1 -アンチトリプシン欠損症、鎌状赤血球症、家族性アミロイドポリニューロパチー、およびハンチントン病等の遺伝子疾患のDNA ②EBウィルス、アデノウィルス、B型肝炎ウィルス、HIV、マイコプラズマ、レジオネラ、およびクラミジア等のウィルス・微生物のDNA ③神経芽細胞腫のN-myc、パーキットリンパ腫のC-myc等の癌疾患のDNA ④心疾患におけるLDLレセプター、アポA-I、およびアポC-II等のリスクファクターのDNA等がある。

プローブとは、測定すべき特異的核酸と相補的な核酸の断片である。一般に1~20 kb（キロ塩基）のものが用いられているが、合成オリゴヌクレオチドプローブ（約20~50ヌクレオチド）を用いることもできる（高橋、DNAプローブ—技術と応用—、（株）シーエムシー、1988年発行）。これらのプローブは通常（A）以下の工程において、担体または

標識との結合に関与する官能基を1種または2種以上結合させて用いる。ここでいう官能基とは、プローブに導入した特異的な結合性を有する物質であり、抗原（ハプテンを含む）-抗体、酵素-補酵素等のアフィニティー結合物質対の一方を用いる。

官能基としては、例えば、ジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン、ビオチン、抗原、および抗体等が挙げられる。特に分子量の小さい、ハプテンやビオチン等が好ましい。これらは公知の方法により、プローブに導入できる。ビオチン基に関しては、ランガー(P.R.Langer)〔プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 第78巻、第6633頁(1981)〕、フォスター(A.C.Foster)他〔ヌクレックアシズ リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第13巻、第745頁(1985)〕等、ジニトロフェニル基に関しては、シュロイヤー(K.R.Shroyer)〔ジャーナル

オブ セル バイオロジー(J.Cell. Biol.) 第97巻、第377a頁(1983)〕等、参照のこと。

また、官能基を結合させる際、官能基とプローブの間に核酸-プローブ複合体に影響を与えずに切断することができる結合を導入してもよい。このような例として、-S-S-結合、ビオチン-アビジン結合、および抗原（ハプテンを含む）-抗体結合等が挙げられる。

また、これらのプローブの一つは、工程(C)の測定の際に利用される標識を結合させて用いてもよい。標識としては免疫学的測定法において用いられるいずれの物質でもよく、酵素、放射性物質、発光物質、蛍光物質、および金属化合物等が挙げられる。例えば、酵素では、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、放射性物質としては、りん(^{32}P)、ヨウ素(^{125}I)、水素(^3H)、蛍光物質としてはフルオレセインイソチシアネート、発光

物質としては、アクリジウム塩、金属化合物としては、ユーロビウム(Eu^{3+})等が好適である。標識を結合させる方法としては、従来の核酸プローブ法における技術を何れでも用いることができる。酵素標識プローブに関しては、レンツ(H.Renz)他〔ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.) 第12巻、第3435頁(1984)〕、ヤブロンスキー(E.Jablonski)他〔ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.) 第14巻、第6115頁(1986)〕：蛍光物質標識プローブに関しては、ルース(J.Ruth)他〔ディーエヌエー(DNA) 第3巻、第122頁(1984)〕、プロバー(J. Prober)他〔サイエンス(Science) 第238巻、第336頁(1987)〕等、公知の方法にて作成できる。

これらの官能基、標識は、(A)から(C)の工程に影響を及ぼさないキャリアを介在させてプローブに結合させても良い。キャリアとしては、蛋白質や鎖状の有機化合物、

ポリヌクレオチド等が挙げられる。例として、アル・ハキムら〔ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.) 第14巻、第9965頁(1986)〕による、DNAプローブにヒストンH1、チトクロムCおよびポリエチレンジアミン(分子量60,000)を介して、ビオチン分子を結合させている報告がある。また、検体DNAとハイブリダイズしていない、DNAプローブの一端と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドを介して、DNAプローブとビオチンを結合させているアーディア他〔特開昭62-188970〕の技術がある。

プローブは少なくとも2種以上作成し、測定の対象や目的により、最適な組み合わせを任意に選択するが、代表例として下記のような組み合わせが挙げられる。

- ① プローブA-官能基
プローブB-標識
- ② プローブA-官能基1
プローブB-官能基2

③ プローブ A-官能基 1

プローブ B-官能基 2

プローブ C-標識

④ プローブ A-官能基 1、官能基 2

プローブ B-標識

②のように標識プローブをハイブリダイズさせる時に用いない場合には、後に官能基の標識化を行う。その方法については、工程(C)の項で述べる。

担体としては、従来サンドイッチ法測定法において使用されている物全てを使用しうる。例えば、ポリスチレン、ポリアクリル、テフロン、紙、ガラス、アガロース等の他、ニトロセルロース、ナイロンが挙げられる。また、その形状はどのようなものであっても良い。担体は、工程(A)で形成される複合体を結合させるため、または、担体上で複合体を形成させるために反応基を結合させておく。反応基は、プローブに結合された官能基と特異的に結合するものならば、どのようなもの

〜72°C、10〜20時間行う。このようにして形成された核酸-プローブ複合体は免疫学的測定に通常用いられる条件で、担体に結合させる。プローブと測定すべき核酸を反応させ、核酸-プローブ複合体形成後、担体と結合させる方法、または、プローブと測定すべき核酸と担体とを同時に加えて、核酸-プローブ複合体形成を担体上で行わせる方法等がある。後者は工程を簡略にできるので望ましい。

担体上に複合体を結合させた後、一般には担体の洗浄を行う。洗浄は免疫学的測定法で用いる公知の方法で行われる。

工程(B)について

本工程はバックグラウンドの原因となる、担体に非特異的に結合した標識プローブ及び非特異的な核酸から、核酸-プローブ複合体を含む成分を選択的に分離する工程である。

複合体の解離は下記のいずれかの結合を切断して行う。

でも良く、例えば、官能基がジニトロフェニル基、トリニトロフェニル基等のハプテンのときは、抗ハプテン抗体、官能基がビオチンのときは、アビジンまたはストレプトアビジン、官能基が抗原または抗体のときは、対応する抗体または抗原が挙げられる。

反応基の担体への結合は、免疫学的測定における担体作成の公知の方法で行われる。

また、反応基と担体の間に、核酸-プローブ複合体に影響を与えずに切断することができると結合を導入してもよい。このような例として、-S-S-結合、ビオチン-アビジン結合、および抗原(ハプテンを含む)-抗体結合等が挙げられる。

工程(A)は次の手順で行う。

まず、被検液に2種以上のプローブを加えて、通常のDNAプローブ法で用いられる条件下、測定すべき核酸とプローブから構成される複合体を形成させる。反応は一般には20〜75°C、数時間〜数十時間、好ましくは65

1) 官能基と反応基の結合

2) 官能基とプローブの結合

3) 反応基と担体の結合

核酸-プローブ複合体に影響を与えずに解離させる好ましい方法は、①上記の結合に関与する結合物質対において、一方の物質と置換しうる反応部位を有する物質を加えること、②還元剤または酸化剤を加えること、等である。具体的には、結合がジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン-抗ハプテン抗体のときには、ジニトロフェニルアミノ酸(例:ジニトロフェニルリジン)、ビオチン-アビジンまたはストレプトアビジンのときには、ビオチンを添加する。結合が-S-S-である場合、-S-S-を切断する試薬、例えば2-メルカプトエタノール等を用いる。

工程(C)について

工程(B)で解離された核酸-プローブ複合体を含む成分を定量する工程である。

解離された該成分はそのまま溶液状態で定量しても良く、また他の担体に結合させ、洗浄後定量しても良い。この他の担体への結合は公知の材料、方法にて行うことができる。そして、免疫学的測定に通常用いられる方法で定量する。測定法の例として、放射性同位元素、酵素、蛍光物質等を用いた方法が、臨床病理 (The Japanese Journal of Clinical Pathology)、臨時増刊特集第53号、昭和58年2月28日発行) に総括されている。

解離された核酸-プローブ複合体を含む成分を測定するには、該成分中の標識を用いる。従って、工程(A)の項で記載したように、標識プローブを工程(A)のハイブリダイゼーションに用いない場合は、後の工程で反応基を結合させた標識を加え、核酸-プローブ複合体上の官能基に結合させて標識化を行う。

ここで用いる反応基と官能基は、工程(A)で担体と核酸-プローブ複合体との結合に用いる様なアフィニティ結合物質対であり、強

い結合性を有するものが好ましい。例としてアビジン-ビオチンが挙げられる。反応基と結合させた標識は当分野で公知の方法により作成される。標識と官能基及び反応基の選択は任意であるが、標識化に用いる反応基-官能基は、担体と核酸-プローブ複合体の結合に関与している反応基-官能基とは異なるものを選ぶ。また、担体との結合に関与しているプローブには標識を導入しない。

標識化する時点は任意であるが、溶液状態で定量する場合は、担体から核酸-プローブ複合体を最終的に解離する前に行う。また、他の担体上で定量する場合は最終的な担体洗浄の前の適切な時点を選んで行う。

例を挙げれば、①工程(A)の核酸-プローブ複合体形成後②工程(B)の複合体解離前③工程(C)の他の担体への複合体結合後、等である。

このハイブリダイゼーション終了後に標識を導入する方法は、特に酵素で標識する場合

に好ましい。一般に酵素の分子量は大きいいため、酵素標識プローブを用いた場合、各プローブと、測定すべき核酸とのハイブリダイゼーションが阻害されるかも知れないからである。

以上説明したように、本発明は従来の核酸サンドイッチ法におけるバックグラウンドの原因であった、担体に非特異的に結合する標識プローブおよび非特異的核酸を除くことにより、より高感度に特異的核酸を定量しうる測定法を提供するものである。

以下、本発明を実施例に即して説明するがもとより、これに限られるものではない。

実施例 1

検体用DNA及びプローブ用DNAの調製

測定の実験モデル用DNA及びその一部分と相補的な配列をもつ二種のプローブ用DNAは、全自動DNA合成機MODEL 381A (アプライド・バイオシステム、カルフォルニア州)を用い、同社の操作手引書に従い、公知の方法(M. D. マツシ (M.D. Matteucci)ら、ジャーナル

オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ(J. Am. Chem. Soc.)第103巻、第3185頁(1981))で合成した。合成後、150シリーズセパレーションシステム(アプライド・バイオシステム)を用い、逆相の高速液体クロマトグラフィーにより精製を行った。

上記の方法で調製した各DNAの塩基配列を以下に示す。

検体DNA(51塩基)

5' $\text{no-ACGTTGCCGC CCCGCCGCCG CCTGTCGCTG}$
AGCTCGGACC TGCTCGGCAC G- om 3'

3' $\text{no-TGCAACGGCG GGGCGCGCGC-om}$ 3'

プローブDNA-1(20塩基)

3' $\text{no-CGAGCCTGG ACGACCCGTG C-om}$ 3'
プローブDNA-2(20塩基)

^{32}P 標識DNAプローブの調製

プローブDNA-2 10 μg (1.5nmole)に対して($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)アデノシン3リン酸(アマシャム・ジャパン、東京) 20nmole (5 $\mu\text{Ci/nmol}$)及びT4ポリヌクレオチド・キナーゼ(東洋紡、大阪) 80単位を用い、公知方法(C.C. リチャードソン(C.C. Richardson)、プロシー

ディングス オブ ナショナル アカデミ
オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第54巻, 第158頁 (1965)] で、5' 末端を ^{32}P 標識した。次いでPD-10カラム (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) を用いて0.15M 塩化ナトリウムおよび1mM EDTA を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液でゲルろ過を行った後、70%エタノールで沈澱させて、ブローブを精製した。

ビオチニル-DNAブローブの調製

ブローブDNA-1 10 μg (1.5nmole) に対して、アデノシン3リン酸 (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) 80nmole 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ80単位を用い、公知の方法 [C.C. リチャードソン (C.C. Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミ オブ サイエンス (前出)] で5' 末端にリン酸基を導入した。次いでリン酸基の先にアミノ基を導入し、N-ヒドロキシサクシニミジルビオチンを結合させる公知の方法 (C.

ブミン) IgG (生化学工業、東京) 4.23g を溶解した0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.3) に0.747gの硫酸ナトリウムを少しずつ加え、0℃ 30分間攪拌した後10,000 $\times\text{g}$ で15分間遠心した。沈澱を4.0mlの0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.3) に溶解し、同緩衝液で透析した後、DE-52セルロース (ワットマン、ケント州、イギリス) カラム (1.6 \times 8.0cm) を用いて、塩化ナトリウムの直線濃度勾配による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。IgGを含む分画を集め、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で透析した後IgG濃度を280nmにおける吸光係数1.5 $\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ から求め、0.1 g/ℓ になるように同緩衝液で希釈した。

次いで、この溶液を用いてポリスチレンボール [直径3.2 μm (プレジジョン・プラスチックボール、シカゴ)] 表面上に公知の方法 [石川ら、スカンジナビアン ジャーナル オブ イムノロジー (Scand. J. Immunol.) 第8巻 (補7)

P. バーバラ (C. P. Barbara) ら、ディーエヌエー (DNA)、第4巻、第327頁 (1985)] に従ってブローブDNAの5'末端にビオチン分子を導入した。反応後、前述同様PD-10カラムによるゲルろ過及びエタノール沈澱によりブローブの精製を行った。

^{32}P の放射活性の測定

各ポリスチレンボールに結合した ^{32}P 放射活性の測定は、ポリスチレンボールをキシレン系液体シンチレータACSS II (アマシャム・ジャパン、東京) 5mlを含むミニバイアル中で微しく攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (パッカード、MINAXI TRI-CARB 4000) を用いて5分間計測で行った。

ジニトロフェニル-アビジン結合 ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製

(1) ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相の調製

ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG (生化学工業、東京) 4.23g を溶解した0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.3) に0.747gの硫酸ナトリウムを少しずつ加え、0℃ 30分間攪拌した後10,000 $\times\text{g}$ で15分間遠心した。沈澱を4.0mlの0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.3) に溶解し、同緩衝液で透析した後、DE-52セルロース (ワットマン、ケント州、イギリス) カラム (1.6 \times 8.0cm) を用いて、塩化ナトリウムの直線濃度勾配による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。IgGを含む分画を集め、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で透析した後IgG濃度を280nmにおける吸光係数1.5 $\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ から求め、0.1 g/ℓ になるように同緩衝液で希釈した。

(2) ジニトロフェニル-アビジンの調製

(i) メルカプトサクシニル-アビジンの調製
0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解したアビジンD (ベクター社) 1 μmol にS-アセチルメルカプト-サクシニク-アミンハイドライド (ナカライテスク、京都) を用いて、公知の方法 [石川ら、ジャーナル オブ イムノアッセイ (J. Immunoassay) 第4巻、第209頁 (1983)] に従ってチオール基を導入した。導入されたチオール基の数はアビジン1分子当たり13個であった。

(ii) マレイミド-ジニトロフェニル-アビジンの調製

5.5mM 2,4-ジニトロフェニル-マレイミド塩酸塩 (東京化成、東京) を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 1.7mlと、5.5mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート (同仁化学、熊本) を溶解したN.

N-ジメチルホルムアミド0.17mlとを30℃で30分反応させた。

(iii) ジニトロフェニル-アビジンの調製

(i) で調製したメルカプトサクシニル-アビジン0.54mgを溶解した、5mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 1.0mlと (ii) で調製したマレイミド-ジニトロフェニル-レージン溶液0.43mlとを30℃で30分反応させた後、同緩衝液に溶解した0.1M N-エチルマレイミド (ナカライテスク、京都) 5μlを加え30℃で15分保温した。反応液をセファデックスG-25 (ファルマシア、スウェーデン) カラム (1.0×30cm) を用い、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液でゲルろ過を行った。アビジン1分子当り導入されたジニトロフェニル基の数は7個であった。

(3) ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製

phys. Res. Commun.), 第147巻、第544頁 (1987)) でチオール基を導入した。

(2) マレイミド-ウシ血清アルブミンの調製

ウシ血清アルブミン (ナカライテスク、京都) にN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを用い、公知の方法 (橋田ら、ジャーナルオブ アブライド バイオケミストリー (J. Appl. Biochem.) 第6巻、第56頁 (1984)) に従って マレイミド基を導入した。導入されたマレイミド基の数は、ウシ血清アルブミン1分子当り11個であった。

(3) ビオチニル-ウシ血清アルブミンの調製

(2) で調製したマレイミド-ウシ血清アルブミン10mgを溶解した5mM EDTA を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 2.0mlに (1) で調製したN-ビオチニル-2-メルカプトエチルアミン溶液0.22mlを加え30℃で30分反応させた。反応後、0.1M 2-メルカプトエチルアミンを溶解した5mM EDTA を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 0.05mlを加え、

(1) で調製したウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化ポリスチレンボールを、(2) で調製したジニトロフェニル-アビジンを溶解した (0.1g/μl)、0.1M 塩化ナトリウムおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で、30℃で10時間保温して反応させた。

ポリスチレンボールは、0.1M 塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%アジ化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で保存した。

ビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(1) N-ビオチニル-2-メルカプトエチルアミンの調製

N-ヒドロキシサクシニミジル-ビオチン (ピラスケミカル、イリノイ州) に2-メルカプトエチルアミンを用いて公知の方法 (石川ら、バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション (Biochem. Bio

sephadex G-25 (ファルマシア、スウェーデン) カラム (1.0×30cm) を用い、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) でゲルろ過を行った。ウシ血清アルブミン1分子当りに導入されたビオチン分子は7個であった。

(4) ビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(3) で調製したビオチニル-ウシ血清アルブミン溶液 (0.1g/μl) を用いて、ポリスチレンボール (直径3.2mm (プレジジョン社、シカゴ)) 表面上に公知の方法 (石川ら、スカンジナビアンジャーナル オブ イムノロジー (前出)) で、物理的吸着により不溶化した。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA (n=5)、5ngの³²P標識DNAプローブ、5ngのビオチニル-DNAプローブ、100ngのサケ精子の単鎖DNA、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA および0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.15mlを

65℃、16時間保温した。室温に戻した後、ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化ポリスチレンボールを1個添加し、30℃5時間反応させた。ボールを0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 2mlで2回洗浄した後、150nmoleのジニトロフェニル-レージン(東京化成工業、東京)を溶解した、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 0.15ml中でビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化ポリスチレンボール1個とともに30℃、2時間反応させた。ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化ポリスチレンボールを除去した後、さらに30℃、3時間反応させた。ポリスチレンボールを上述と同様に洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した³²Pの放射活性

ポリスチレンボールに結合した³²Pの放射活性を測定した。結果を第1図に示す。

本発明による実施例の測定限界は10pg (0.6fmole)であった。従来法である比較例に比して、バックグラウンドが約1/8に減少し、3倍の感度向上が認められた。

実施例 2

検体用DNA及びプローブ用DNAの調製、³²P標識DNAプローブの調製、及びウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相の調製は実施例1の方法に従った。

ジニトロフェニル-DNAプローブの調製

(1) 5'-アミノヘキシルホスホールアミデート-DNAの調製

プローブDNA-1 10μg (1.5nmole)に対して、アデノシン3リン酸(ファルマシア、ウブサラ、スウェーデン) 80nmole 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ80単位を用い、公知の方

法(C.C.リチャードソン(C.C. Richardson)、

比較例 1

検体用およびプローブ用DNAの調製、固相の調製、および放射活性の測定は実施例1の方法に従った。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA(n=6)、5ngの³²P標識DNAプローブ、5ngのビオチニル-DNAプローブ、100ngのサケ精子の単鎖DNA、0.15M 塩化ナトリウム1mM EDTA および0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 0.15mlを65℃、16時間保温した。室温に戻した後、ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化ポリスチレンボールを1個添加し、30℃で5時間反応させた。ポリスチレンボールを0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 2mlで2回洗浄した後、

法(C.C.リチャードソン(C.C. Richardson)、ブローディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(前出))で5'末端にリン酸基を導入した。次いで、0.1M イミダゾール-塩酸緩衝液(pH 6.0)中で、1-エチル-3,3'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(ナカライテスク、京都)により導入したリン酸基にイミド基を結合させた後、1,6-ジアミノヘキサン(ナカライテスク)を反応させる公知の方法(A.コレット(A. Chollet)ら、ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)、第13巻、第1529頁(1985))に従って、5'末端にアミノ基を導入した。

(2) サクシニミジル-2、4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸の合成

2,4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸(シグマ社、ミズーリ州)と、N-ヒドロキシサクシニミド(和光純薬工業、大阪)をジクロロカルボジイミド(和光純薬工業)により縮合される公知の方法(F.レビ・シェーファー(F.

levi-schaffer)ら、アメリカン ジャーナル
オブ トロピカル メディシン アンド ハイ
ジーン (Am. J. Trop. Med. Hyg.、第32巻、第
343頁 (1983)) によりサクシニミジル-2、
4-ジニトロフェニル- ϵ -カプロン酸を合成
した。次いで、シリカゲル (40 g) カラムを用
い、クロロホルム/メタノール (40/1 (V/V))
の系で精製を行った後、NMR (核磁気共鳴
法) および質量スペクトル法により構造を確認
した。

(3) ジニトロフェニル-DNAプロープの調製

(1) で調製した5'-アミノヘキシルホスホ
ルアミデート-DNA 150 pmoleを溶解した0.
01M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 50 μ l に、
(2) で調製したサクシニミジル-2、4-ジニ
トロフェニル- ϵ -カプロン酸50 nmoleを含むN,
N-ジメチルホルムアミド50 μ lを加え、20で、
20時間反応させた。反応後R P C-5 カラム
(アプライド・バイオシステム)を用いる公
知の方法 (R.L.ピアソン (R.L. Pearson) ら、パ

mIを65で、16時間保温した。室温に戻し
た後、ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清
アルブミン) IgG 不溶化ポリスチレンボールを
1個添加し、30で、5時間反応させた。ボ
ールを0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び
0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1M リン酸
ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 2 mIで2回洗浄し
た後、150 nmoleのジニトロフェニル-
リジン (東京化成工業、東京)を溶解した、
0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び0.1%
ウシ血清アルブミンを含む0.1M リン酸ナトリ
ウム緩衝液 (pH 7.0) 0.15mI中で30で、2時
間反応させた。

反応後溶液150 μ l 全量を取り、標識DN
Aプロープの 32 P放射活性を測定した。結果
を第2図に示す。

比較例 2

検体用DNA、ジニトロフェニルDNAプロ
ープ、 32 P標識DNAプロープおよびウサギ
(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)I

イオケミカル エト バイオフィジカ アクタ
(Biochem. Biophys. Acta)、第228巻、第7
70頁 (1971)) で高速液体クロマトグラフィー
を行って未反応DNAを除き、さらにエタノ
ール沈殿によりプロープを精製した。

32 Pの放射活性の測定

反応溶液中に含まれる 32 P放射活性の測定は、
反応溶液全量 (150 μ l)をキシレン系液体シン
チレータACS II (アマシャム・ジャパン、東
京) 5mlを含むミニバイアル中で激しく攪拌し
た後、液体シンチレーションカウンター (パッ
カード、MINAXI TRI-CARB 4000) を用いて5分
間計測で行った。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA (n=6)、2
ngの 32 P標識DNAプロープ、2ngのジニトロ
フェニル-DNAプロープ、100ngのサケ精
子の単鎖DNA、0.15M 塩化ナトリウム、1m
M EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む、
0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.15

ng不溶化固相の調製は実施例1の方法に従った。

32 P放射活性の測定

各ポリエスチレンボールに結合した 32 P標識
DNAプロープの放射活性の測定は、ポリスチ
レンボールを液体シンチレータを含むミニバイ
アルに入れ、実施例と同様の条件で計測を行っ
た。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA (n=6)、2
ngの 32 P標識DNAプロープ、2ngのジニトロ
フェニル-DNAプロープ、100ngのサケ精
子の単鎖DNA、0.15M 塩化ナトリウム-1mM
EDTA および0.1%ウシ血清アルブミンを含む、
0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.15
mlを65で、16時間保温した。室温に戻し
た後、ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清
アルブミン) IgG 不溶化ポリスチレンボールを
1個添加し、30で5時間反応させた。ボ
リスチレンボールを0.15M 塩化ナトリウム、1
mM EDTA及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む

0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 2 ml
で2回洗浄した後、ポリスチレンボールに結合
した ^{32}P の放射活性を測定した。結果を第2
図に示す。

本発明による実施例の測定限界は 0.9 pg (50
amole = 5×10^{-17} mole) であった。従来法であ
る比較例に比して、バックグラウンドが約 1 /
3 に減少し、3 倍の感度向上が認められた。

(効果)

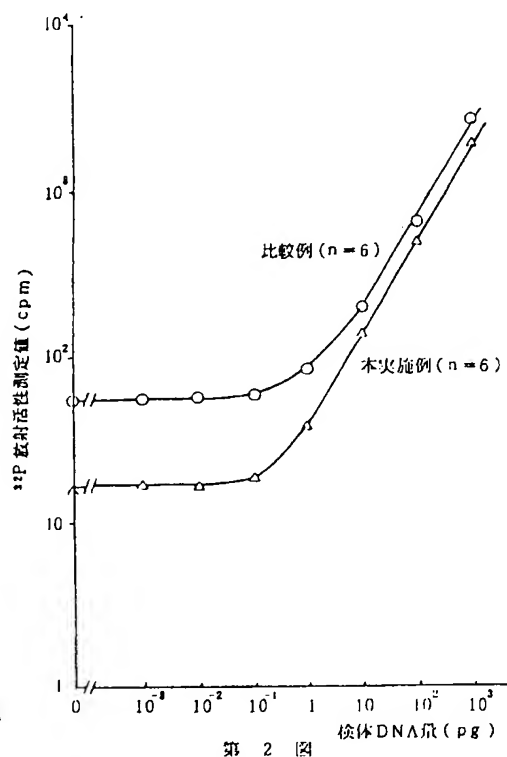
以上、説明したように、本発明は従来サント
イッチ法で測定した核酸を、より高感度に測
定しうる方法を提供するものである。

4. 図面の簡単な説明

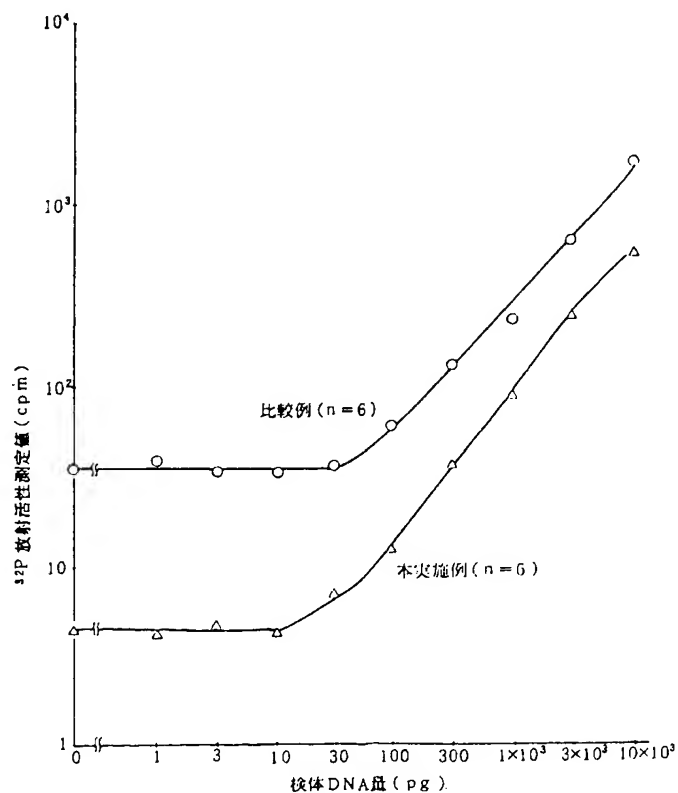
第1図及び第2図は、本発明の実施例、及び
比較例のDNA測定における検量線である。横
軸は、測定対象のDNA量、縦軸に測定値 (^{32}P
P放射活性)を示した。

特許出願人 石川 栄治 (ほか1名)

代理人 弁理士 細田 芳徳



第2図



第1図